

⑤

Int. Cl.:

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

C 07 c, 103/52

A 61 k, 27/00

DEUTSCHES



PATENTAMT

⑥

Deutsche Kl.:

12 q, 6/01

30 h, 2/36

⑩

# Offenlegungsschrift 2 256 445

⑪

Aktenzeichen: P 22 56 445.0

⑫

Anmeldetag: 17. November 1972

⑬

Offenlegungstag: 22. Mai 1974

Ausstellungsriorität: —

⑭ Unionspriorität

⑮ Datum: —

⑯ Land: —

⑰ Aktenzeichen: —

⑲ Bezeichnung: Neuc Heptapeptide mit Gastrinwirkung

⑳ Zusatz zu: —

㉑ Ausscheidung aus: —

㉒ Anmelder: Farbwerke Hoechst AG, vormals MeisterLucius & Brüning,  
6000 Frankfurt

Vertreter gem. § 16 PatG: —

㉓ Als Erfinder benannt: Wissmann, Hans, Dipl.-Chem. Dr., 6232 Bad Soden;  
Geiger, Rolf, Dipl.-Chem. Dr., 6000 Frankfurt;  
Schleyerbach, Rufold, Dr., 6238 Hofheim

DT 2 256 445

ORIGINAL INSPECTED

• 5.74 409 821/1099

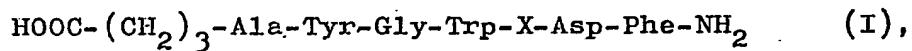
7/90

Aktenzeichen: HOE 72/F 349  
Dr. HG/ka

Datum: 14. November 1972

Neue Heptapeptide mit Gastrinwirkung

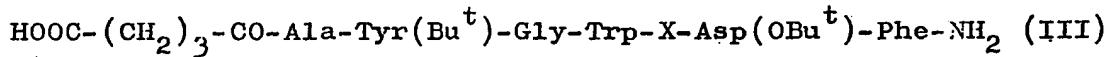
Die Erfindung betrifft neue Heptapeptide der allgemeinen Formel I



in der X für Leucin oder Methionin steht, ferner ein Verfahren zu ihrer Herstellung, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man Peptide der allgemeinen Formel II



in der Bu<sup>t</sup> den tert. Butylrest bedeutet und X die oben angegebene Bedeutung besitzt, mit Glutarsäure-anhydrid umsetzt und aus den Reaktionsprodukten der allgemeinen Formel III



die Schutzgruppen durch Behandeln mit Trifluoressigsäure entfernt.

409821/1099

Es sind zahlreiche synthetische Peptide aus dem C-terminalen Bereich des Gastrins beschrieben worden, die ähnlich dem natürlichen Hormon Gastrin die Stimulation des Magens hinsichtlich Säureproduktion und Volumenausschüttung bewirken. Unter diesen synthetischen Peptiden ragt das Pentapeptid der Formel IV



hervor, in dem Boc für den tert.-Butyloxycarbonylrest steht (The Lancet 1966, Seite 993), und das die stärkste stimulierende Wirkung, verglichen mit anderen synthetischen Peptiden, zeigt.

Mit diesem Pentapeptid IV wurde auch bereits ein Heptapeptid verglichen, das sich von der erfindungsgemäßen Verbindung der Formel I mit X = Met nur durch das Fehlen des Glutaroylrestes unterscheidet. Es zeigt eine dem Peptid IV vergleichbare biologische Wirkung.

Dagegen übertrifft das erfindungsgemäße Peptid der Formel I, in der X für Methionin steht, das Peptid der Formel IV in seiner biologischen Wirkung um das 1.3-fache, das erfindungsgemäße Peptid der Formel I mit X = Leucin das Peptid der Formel IV sogar um das 3-fache, auf molarer Basis berechnet.

Die biologische Wirkung wurde am perfundierten Rattenmagen nach Brit. J. Pharmacol. 38 (1970), Seite 206-213, bestimmt.

Zur Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formel I setzt man die Peptide der Formel II mit Glutarsäure-anhydrid bei Raumtemperatur in Dimethylformamid um, wobei Reaktionszeiten von etwa 4-20 Stunden bei 0-5° ausreichend sind, destilliert das Lösungsmittel i. Vak. ab und verreibt den Rückstand mit Äther. Die Schutzgruppen werden mit 90-proz. Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur (Reaktionszeit etwa 1 Stde.) abgespalten. Zur Reinigung der Peptide der allgemeinen Formel I genügt z. B. Umfällen aus Alkohol/Äther.

409821/1099

Die erfindungsgemäßen neuen Peptide sind Arzneimittel. Sie sind frei von unphysiologischen Komponenten, dienen zur Anregung der Magensaftproduktion und können entweder als Diagnostica zur Funktionsprüfung des Magens oder als Therapeutika bei verminderter Sekretion von Verdauungssäften in Magen, Galle und Bauchspeicheldrüse verwendet werden.

Die parenterale Verabreichungsform ist eine 0,001 bis 0,1 %ige wässrige Lösung, gegebenenfalls unter Zusatz physiologischer Mengen Kochsalz oder in gepufferter wässriger Lösung. Als Puffer kann z. B. verwendet werden:

m/15 Phosphat-Puffer (primäres Kaliumphosphat und sekundäres Natriumphosphat nach Sörensen und Clark) mit pH-Werten von 5,0 bis 7,5. Diese Lösungen dienen zur Subkutanen und intramuskulären Anwendung.

Zur nasalen Anwendung verwendet man ca. 0,1 %ige wässrige Lösungen, 0,1 bis 3 %ige ölige Suspensionen oder ein 0,1 bis 3 %iges Trockenpulver, z. B. mit Lactose oder Mannit als Träger.

Beispiele

Zur Reinheitsprüfung der nachfolgend hergestellten Verbindungen dient die Dünnschicht-Chromatographie mit folgenden Laufmittelsystemen:

- 1) tert.-Butanol/Pyridin/Petroläther, 1:1:8
- 2) Methanol/Wasser 80:20
- 3) Methyläthylketon/Pyridin/Wasser/Eisessig 70:15:15:2
- 4) Butanol/Essigsäure/Wasser 2:1:1

Es werden die in der Peptidchemie üblichen Abkürzungen verwendet; Dicyclohexylcarbodiimid = DCC; Dimethylformamid = DMF.

BEISPIEL 1

Glutaroyl-Ala-Tyr-Gly-Trp-Leu-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>

a) Z-Tyr(Bu<sup>t</sup>)-Gly-OCH<sub>3</sub>

Man löst 74 g (0,2 Mol) Z-Tyr(OBu<sup>t</sup>)-OH und 54 g (0,4 Mol) 1-Hydroxybenzotriazol in 300 ml Tetrahydrofuran, kühlt auf -5° und gibt dann die Lösung von 42 g (0,2 Mol) DCC in 50 ml Tetrahydrofuran zu. Anschließend wird eine Stunde bei 0° und eine Stunde bei Raumtemperatur nachgerührt. Dann wird vom ausgeschiedenen Dicyclohexylharnstoff abgesaugt. Zu der verbleibenden Lösung gibt man bei 0° eine Lösung von 25 g (0,2 Mol) Glycin-methylester-hydrochlorid und 27 ml (0,2 Mol) N-Äthylmorpholin in 150 ml Tetrahydrofuran. Anschließend wird noch 2 Stunden bei Raumtemperatur nachgerührt, dann destilliert man das Lösungsmittel im Vakuum bei Raumtemperatur ab, nimmt den Rückstand in Essigester auf, und schüttelt die

Essigesterlösung mit 0,2 n-Schwefelsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser. Nach dem Trocknen der Essigesterlösung über Magnesiumsulfat wird das Endprodukt durch Abdampfen des Lösungsmittels i. V. als schwach gelbliches Öl erhalten. Das Produkt ist

409821/1099

dünnschichtchromatographisch einheitlich in den Systemen  
1, 2, 3 und 4.

Ausbeute: 64 g (73 % d. Th.)

b) H-Tyr(Bu<sup>t</sup>)-Gly-OCH<sub>3</sub>, HCl

60 g Z-Tyr(Bu<sup>t</sup>)-Gly-OMe in 1 l Methanol werden 10 g 10-proz.  
Pd/BaSO<sub>4</sub> unter Zugabe von 1 n methanol. HCl bei pH 3 kataly-  
tisch hydriert. Nach Abtrennen des Katalysators wird das  
Lösungsmittel abdestilliert. Das zurückbleibende Harz wird  
beim Verreiben mit Äther fest. Ausbeute 45 g, Schmp. ab  
97° unter Aufschäumen.  $[\alpha]_D^{20} = + 27.0^\circ$  (c=1 in Methanol).

c) Z-Ala-Tyr(Bu<sup>t</sup>)-Gly-OCH<sub>3</sub>

Zu einer Lösung von 29 g (0.13 Mol) Z-Ala-OH und 35 g 1-Hy-  
droxybenzotriazol in 240 ml DMF werden bei 5° 29 g DCC ge-  
geben. Man röhrt 1 h bei 0° und 1 h bei Raumtemperatur, fil-  
trierte vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und gibt  
die Lösung von 44.8 g (0.13 Mol) H-Tyr(Bu<sup>t</sup>)-Gly-OCH<sub>3</sub>, HCl  
und 16.5 ml N-Äthylmorpholin in 300 ml DMF zu. Nach dreistün-  
diger Reaktionszeit bei Raumtemperatur wird das Lösungsmittel  
i. Vak. abdestilliert, der Rückstand in Essigester aufgenom-  
men, die Essigesterlösung mit 1 n HCl, gesättigt. Natrium-  
hydrogencarbonat und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat  
getrocknet und i. Vak. eingedampft. Das halbfeste Reaktions-  
produkt wird beim Digerieren mit Äther fest. Ausb. 46, 5 g  
(70 %), Schmp. 107°.  
 $[\alpha]_D^{20} = -34.9^\circ$  (c=1 in Methanol)  
C<sub>27</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> (513) Ber. C 63.1 H 6.8 N 8.2  
Gef. C 63.4 H 6.9 N 8.1

Dünnschichtchromatographisch einheitlich in den Systemen 1  
und 2.

d) Z-Ala-Tyr(Bu<sup>t</sup>)-Gly-OH

44.6 g Methylester in 150 ml Dioxan und 89 ml 1 n Natronlauge werden 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Man neutralisiert mit 1 n HCl, dampft i. Vak. auf 1/3 des ursprünglichen Volumens ein und stellt mit 1 n HCl auf pH 3. Das ausgefallene Öl wird in 700 ml Äther aufgenommen. Die über MgSO<sub>4</sub> getrocknete Lösung wird mit 250 ml Petroläther versetzt. Der Niederschlag kristallisiert innerhalb einiger Tage bei 0° durch.

Ausbeute: 37.4 g (88 %) Schmp. 89°.  $[\alpha]_D^{20} = -42.7^\circ$  (c=1 in Methanol)

Dünnschichtchromatographisch einheitlich in den Systemen 1 und 2.

e) Z-Trp-Leu-OH

83 g Z-Trp-Leu-OMe, hergestellt nach J. Org. Chem. 31 (1966), Seite 3400, werden in einer Mischung aus 500 ml Dioxan und 100 ml 2 n NaOH 100 Min. gerührt. Man bringt mit 1 n HCl auf pH 6, engt ein, versetzt mit etwas Wasser und stellt das pH mit 1 n HCl auf 3. Das ausgefallene Produkt wird aus Methanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 72.5 g, Schmp. 70°,  $[\alpha]_D^{20} = -27.5^\circ$  (c=1 in Methanol).

f) Z-Trp-Leu-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>

Zu der Lösung von 23.8 g (52 mMol) Z-Trp-Leu-OH, 19.5 g (52 mMol) H-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>·HCl, hergestellt nach J. Chem. Soc. (C) 1966, Seite 555, 12 g N-Hydroxysuccinimid und 6.65 ml N-Äthylmorpholin in 400 ml Tetrahydrofuran gibt man bei -5° unter Rühren die Lösung von 10.8 g DCC in 18 ml Tetrahydrofuran. Man lässt unter Rühren auf Raumtemperatur kommen. Nach Stehen über Nacht filtriert man ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und bringt die Lösung i. Vak. zur Trockene. Das zurückbleibende Öl wird mit 5-proz. Citronensäure, gesättigt.

Natriumhydrogencarbonat und Wasser digeriert, i. Vak. über  $P_2O_5$  getrocknet und mit wenig Äthanol ausgekocht.

Ausbeute: 31,5 g, Schmp.  $212^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{20} = -36.7^\circ$  ( $c=1$  in DMF)  
Dünnschichtchromatographisch einheitlich in den Systemen  
1, 2, 3 und 4.

g) H-Trp-Leu-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>, HCl

7.68 g Z-Tetrapeptid werden in 350 ml Methanol analog Beispiel 1b) katalytisch hydriert. Nach üblicher Aufarbeitung werden 6.5 g eines amorphen Produkts erhalten.  $[\alpha]_D^{20} = -22^\circ$  ( $c=1$  in Methanol). Dünnschichtchromatographisch einheitlich in den Systemen 1, 2, 3 und 4.

h) Z-Ala-Tyr(Bu<sup>t</sup>)-Gly-Trp-Leu-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>

0.5 g (1 mMol) Z-Ala-Tyr(Bu<sup>t</sup>)-Gly-OH, 0.64 g (1 mMol) H-Trp-Leu-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>, HCl hergestellt aus der Z-Verbindung durch katalytische Hydrierung (Beispiel g), 0.27 g (2 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol und 0.13 ml N-Äthylmorpholin werden in 10 ml DMF gelöst, bei  $0^\circ$  mit 0.24 g DCC versetzt und 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Man filtriert vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und engt die Lösung i. Vak. ein. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen und unterhalb  $5^\circ$  mit 10-proz. Citronensäure extrahiert, dann bei Raumtemperatur mit gesättigtem Natriumhydrogencarbonat und Wasser gewaschen. Nach Trocknen der Essigesterlösung über  $MgSO_4$  wird eingeengt. Dabei fallen 450 mg des Z-Hepta-peptids aus. Weitere 193 mg lassen sich aus der Mutterlauge durch Fällen mit Äther gewinnen. Schmp.  $192^\circ$ ,

$[\alpha]_D^{20} = -27.8^\circ$  ( $c=1$  in DMF).

Aminosäureanalyse: Asp 1.0, Gly 0.99, Ala 1.02,  
Leu 0.98 Tyr 0.90, Phe 0.99  
 $Tyr/Trp = 1.03$

Dünnschichtchromatographisch einheitlich in den Systemen  
1, 3 und 4.

409821/1099

i) H-Ala-Tyr(Bu<sup>t</sup>)-Gly-Trp-Leu-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>, NC1

4 g Z-Heptapeptid werden in 1.3 l Methanol analog Beispiel 1 b katalytisch hydriert. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels digeriert man den Rückstand mit Äther und erhält 2.8 g vom Schmp. 199-200° (Zers.).

k) Glutaroyl-Ala-Tyr(Bu<sup>t</sup>)-Gly-Trp-Leu-Asp-OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>

Zur Lösung von 8.8 g (12 mMol) des H-Heptapeptid-hydrochlorids in 50 ml DMF werden innerhalb 40 Min. 2.3 g (20 mMol) Glutarsäureanhydrid und 2.56 ml N-Äthylmorpholin bei 0° unter Röhren portionsweise eingetragen. Man röhrt 5 h bei 0° und lässt 16 h bei 4° stehen, destilliert das Lösungsmittel i. Vak. ab und digeriert den Rückstand mit Äther. Ausb. 8.8 g, Schmp. 230-232° (Zers.)

$$[\alpha]_D^{20} = -31^\circ \text{ (c=1 in DMF)}$$

l) Glutaroyl-Ala-Tyr-Gly-Trp-Leu-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>

1.27 g des geschützten Glutaroyl-heptapeptids werden in 5 ml 90-proz. Trifluoressigsäure 90 Min. bei Raumtemperatur gerührt. Dann destilliert man die Trifluoressigsäure i. Vak. ab, digeriert den Rückstand mit Äther und fällt aus Äthanol/Äther um. Ausb. 620 mg. Schmp. 213° (Zers.)

$$[\alpha]_D^{20} = -33.8^\circ \text{ (c=1 in DMF).}$$

Aminosäureanalyse: Asp 1.09, Gly 1.00, Ala 1.07,  
Leu 1.08, Tyr 0.69, Phe 1.02

Tyr/Trp = 1.02

Dünnschichtchromatographisch einheitlich in den Systemen 2, 3 und 4.

BEISPIEL 2

Glutaroyl-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>

a) Z-Ala-Tyr-(Bu<sup>t</sup>)-Gly-Trp-Met-Asp-(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>

17.7 g Z-Ala-Tyr(Bu<sup>t</sup>)-Gly-OH, hergestellt nach Beispiel 1 d),  
23 g H-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub> hergestellt nach J. Chem.  
Soc. (C), 1967, Seite 2410, und 9.6 g 1-Hydroxybenzotriazol  
werden in 120 ml DMF gelöst. Man gibt bei 0° 8 g DCC zu und  
röhrt dann über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Abfiltrieren  
des Dicyclohexylharnstoffs wird die Lösung i. Vak. eingeengt,  
der Rückstand mit Wasser, 0.2 n HCl, gesättigtem Natriumhydro-  
gencarbonat und Wasser verrieben und im Hochvak. über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>  
getrocknet. Ausb. 37.3 g, Schmp 228°,

$$[\alpha]_D^{20} = -27.9^\circ \text{ (c=1 in DMF)}$$

C<sub>59</sub>H<sub>75</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub>S (1133) Ber. C 62.5 H 6.62 N 11.1 S 2.82

Gef. C 62.6 H 6.7 N 11.1 S 2.9

b) H-Ala-Tyr(Bu<sup>t</sup>)-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>

37 g des Z-Heptapeptids werden in 400 ml DMF unter Zusatz  
von 15 ml Cyclohexylamin und reichlich Pd katalytisch hydriert.  
Nach beendeter Abspaltung der Z-Gruppe wird vom Katalysator  
abfiltriert, die Lösung i. Vak. zur Trockene gebracht und der  
Rückstand mit Äther verrieben. Zur weiteren Reinigung wird  
aus DMF/Äther/Petroläther gefällt. <sup>20</sup>  
Ausb. 24.3 g, Schmp. 209° (Z),  $[\alpha]_D^{20} = -22.5^\circ \text{ (c=1 in DMF)}$ .

c) Glutaroyl-Ala-Tyr(Bu<sup>t</sup>)-Gly-Trp-Met-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Phe-NH<sub>2</sub>

Zu der Lösung von 12 g des H-Heptapeptids in 60 ml DMF gibt  
man innerhalb 40 Min. 3 g Glutarsäureanhydrid und 4.3 ml  
N-Äthylmorpholin bei 0° unter Rühren portionsweise zu. Man  
röhrt noch 5 h bei 0° und lässt 16 h bei 4° stehen. Dann  
destilliert man das Lösungsmittel i. Vak. ab und digeriert  
den Rückstand mit Äther. Ausb. 10.3 g, Schmp. 231° (Zers.)

$$[\alpha]_D^{20} = -31^\circ \text{ (c=1 in DMF)}$$

409821/1099

d) Glutaroyl-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>

10.1 g des geschützten Glutaroyl-heptapeptids werden in 50 ml 90-proz. Trifluoressigsäure gelöst. Nach 75 Min Stehen bei Raumtemperatur destilliert man die Trifluoressigsäure i. Vak. ab, digeriert den Rückstand mit 10 ml Äthanol und setzt dann 100 ml Äther zu.

Zur Reinigung wird aus Methanol/Äther umgefällt.

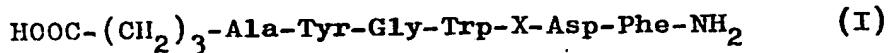
Ausb. 9.65 g, Schmp. 216°,  $[\alpha]_D^{20} = -31.2^\circ$  (c-1 in DMF).

Aminosäureanalyse: Asp 0.96, Gly 0.94, Ala 0.93, Met 0.85,  
Tyr 0.99, Phe 1.00

Tyr/Trp = 1.04

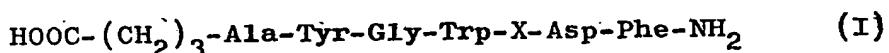
P a t e n t a n s p r ü c h e

1) Heptapeptide der allgemeinen Formel I



in der X für Leucin (Leu) oder Methionin (Met) steht.

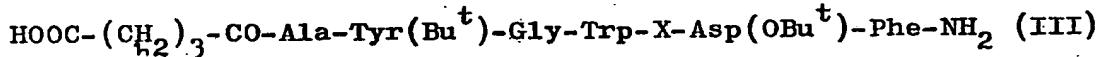
2) Verfahren zur Herstellung von Hepta-peptiden der allgemeinen Formel I



in der X für Leu oder Met steht, dadurch gekennzeichnet,  
daß man Peptide der allgemeinen Formel II



in der Bu<sup>t</sup> den tert. Butylrest bedeutet und X die oben angegebene Bedeutung besitzt, mit Glutarsäure-anhydrid umgesetzt und aus den Reaktionsprodukten der allgemeinen Formel III



die Schutzgruppen durch Behandeln mit Trifluoressigsäure entfernt.

3) Pharmazeutische Präparate mit anregender Wirkung auf die Magensaftproduktion, gekennzeichnet durch einen Gehalt an einer Verbindung nach Anspruch 1.

4) Verfahren zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten dadurch gekennzeichnet, daß man eine Verbindung nach Anspruch 1 gegebenenfalls mit üblichen Trägerstoffen in eine für therapeutische oder diagnostische Zwecke geeignete Anwendungsform bringt.